

## 論文審査の要旨

報告番号	甲 第2626号	氏名	氷室 沙羅
論文審査担当者	主査 口腔生理学 井上 富雄 副査 口腔微生物学 桑田 啓貴 副査 歯科補綴学 馬場 一美		
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「The junctional epithelium originates from the odontogenic epithelium of erupted tooth.」について、上記の主査1名、副査2名が個別に審査を行った。</p> <p>【目的】これまで、接合上皮の起源は歯原性上皮であるとされてきたが、特異的マーカーが存在しないことより、接合上皮の由来に関する確定的な報告はなされていない。そこで、今回、我々は、GFPマウスより歯原性上皮組織を採取し、再構成歯胚を作製し、その萌出過程を観察することで、接合上皮が歯原性上皮由来である可能性を検証した。</p> <p>【方法】GFPマウス歯胚(E15)より採取した歯原性上皮と、野生型(以下, WT)マウス歯胚(E15)より採取した間葉組織をin vitroで再構成し、GFP(+)上皮・WT間葉の再構成歯胚を作成した。この歯胚を、WTマウスの上顎第一大臼歯抜去後に治癒を確認した同部に移植・萌出させた。その後、GFP陽性細胞の局在を観察することにより、接合上皮の由来を解析した。次に、再構成歯由来の歯原性上皮が正常の退縮過程を経ていることをTunel染色により確認し、また、再構成歯由来の接合上皮が正常の構造を有することをlaminin5, integrin <math>\beta_4</math>で確認した。さらに、接合上皮の増殖能を、BRdU-EdUダブルラベル法を用いて検討した。</p> <p>【結果】移植後16日で、GFP陽性のエナメル芽細胞が、移植後40日で、GFP陽性の退縮エナメル上皮が観察された。移植後50日で再構成歯は咬合面に達し、この時点で、接合上皮の大部分はGFP陽性細胞より構成されており、移植後140日(萌出後3ヶ月)でも維持されていた。次に、移植後30日(萌出開始期)の天然歯と再構成歯でTunel染色を行った所、退縮エナメル上皮の先端で陽性細胞が検出された。再構成歯の一次接合上皮で、正常の萌出過程同様にアポトーシスが観察されたことから、再構成歯の接合上皮は、天然歯の接合上皮の発生過程を模倣することが示唆された。さらに、天然歯と同様に再構成歯でも、integrin <math>\beta_4</math>は接合上皮の全層と口腔上皮の基底層で、また、laminin5は接合上皮の歯と接する部分と口腔上皮の基底層で発現が確認された。天然歯で発現が確認されているintegrin <math>\beta_4</math>, laminin5が、萌出後の再構成歯の接合上皮でも観察されたことから、再構成歯の萌出によって形成された接合上皮が天然歯の構造を再現していることが推察される。また、EdU-BRdUのダブルラベル法では、天然歯由来の接合上皮同様、再構成歯由来の接合上皮でも、EdUとBRdUともに陽性の細胞が認められた。BRdUとEdUの共陽性の細胞が存在することから、接合上皮に一定周期で、分裂を繰り返す幹細胞様の細胞が存在する可能性が示唆された。</p> <p>【結論】今回の実験で、我々は、GFP(+)上皮・WT間葉の再構成歯の萌出に伴って形成された接合上皮がGFP(+)であることから、接合上皮が歯原性上皮由来であり、少なくとも萌出後3ヶ月の時点まで維持されることが明らかとなった。</p>			

本論文の審査にあたり副査から多くの質問があり、その一部と回答を以下に示す。

桑田委員の質問とそれに対する回答：

1. EdUとBRdUの違いを述べよ。

(BRdUは、チミジンのヌクレオシド類似体で、DNA合成の際にDNAに取り込まれる。取り込んだ細胞は、抗BrdU抗体を使って免疫染色により検出するが、抗体が接近出来るようDNAを変性しなければならない。このため、免疫染色前に、塩酸によって組織切片を処理することが広く行われている。一方、EdUもチミジンのヌクレオシド類似体であり、DNA合成の際にDNAに取り込まれるが、検出は、Alexa Fluor®色素が含まれるアジドと、EdUに含まれるアルキン間の銅触媒共有結合反応によって行われる。BRdU、EdUは、分裂期の細胞を検出する方法として、数多くの文献で用いられており、非常に信用性が高いが、BRdUはDNA損傷を否定出来ないため、一般に、EdUの方が、より高感度と考えられている。)

2. 接合上皮に幹細胞様の細胞が存在したとのことだが、具体的に、何か特定の幹細胞マーカーを用いた検証は行ったか？

(Lrig1の検討を行った。Lrig1は毛包や小腸のstem cellマーカーである。毛髪と歯は、上皮間葉の相互作用により発生する点が類似し。また、接合上皮で発現を認めるSLPI(抗菌タンパクの一種)は小腸でも発現する。以上の点を考慮して、Lrig1の検討を行ったが、脱灰の影響が強く、発現を確認出来なかった。しかし、硬組織形成前の帽状期歯胚で発現を確認したため、今後、非脱灰の再構成歯胚由来の接合上皮の切片を作成し、検証を続ける予定である。)

馬場委員の質問とそれに対する回答：

1. 再構成歯胚の機能的検証は行ったか。

(過去、接合上皮で発現の確認されている100A8が、再構成歯由来の接合上皮で発現することを確認した。S100A8は、S100A9と二量体を形成し、抗菌ペプチドの1種、カリプロテクチンを産生する。よって、少なくとも接合上皮の機能の一つである、口腔常在菌の感染に対し、自然免疫の場を提供する機能は、再構成歯も有するものと考える。)

2. 萌出直後の接合上皮を長期的に観察した際に、予想される転機として考えられるのは何か。

(萌出後3ヶ月の接合上皮でGFPの減弱が観察されたことから、徐々に口腔上皮に置換されていく可能性が高いと考える。また、過去の報告で、切除した接合上皮の再生過程で、歯原性由来のタンパクの発現が確認されていることから、一部、接合上皮の基部に幹細胞様の性質を持った歯原性上皮由来の細胞が維持され、組織治癒に役立つのではないかと推察する。)

両委員共通の質問とそれに対する回答：

1. 接合上皮が歯原性上皮であることを実証する臨床的意義は何か？

(歯周外科の際に接合上皮を切除すると、エナメル質あるいはセメント質と長い上皮性の付着で治癒することが広く知られている。しかし、この治癒形態は、正常な接合上皮と比較し、細胞の配列が断続的で、細胞間隙が広く、非常に脆弱である。接合上皮が歯原性上皮由来であり、口腔上皮から再生される接合上皮とは性質を異にすることが明らかとなれば、今後の治療方法に影響を与えると考える。)

これらの試問に対する回答は、適切かつ明解であった。また、井上委員は主査の立場から、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認した。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。